

METHOD AND DEVICE FOR ELECTRICALLY BORING CELL

Patent Number: JP2131584
Publication date: 1990-05-21
Inventor(s): ITO HIROYASU
Applicant(s): HAMAMATSU PHOTONICS KK
Requested Patent: ☐ JP2131584
Application Number: JP19880284177 19881110
Priority Number(s):
IPC Classification: C12N15/87; C12M1/00; C12N13/00
EC Classification:
Equivalents: JP1955259C, JP6087782B

Abstract

PURPOSE: To form a small hole having same size in same position of cell membrane of each cell in controlled state by dispersing a cell into a medium liquid, applying alternating current electric field to arrange the cell in electric field of alternating current electric field and applying direct current pulse electric field in the direction crossing with the electric field direction.

CONSTITUTION: A medium liquid 2 containing a cell 1 is put in recessed part 11 of substrate and a switch S1 is turned on and alternating current electric field is applied to a medium liquid 2 from electrodes 3A and 3B to arrange the cell 1 in the direction of electric field of alternating current. Then a switch S2 is turned on and direct current pulse electric field is applied from electrodes 6A and 6B to form small hole 4 in a cell membrane of each cell 1. DNA, etc., in a medium liquid 2 is taken in the cell 1 through the small hole 4 and then switch S2 is turned off to release application of direct current pulse electric field and small hole 4 of cell are gradually repaired. Thereby DNA, etc., can be taken in a number of cells in same conditions.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-131584

⑮ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成2年(1990)5月21日

C 12 N 15/87
C 12 M 1/00
C 12 N 13/00

B 8717-4B
7329-4B
8717-4B

C 12 N 15/00

A

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全6頁)

⑭ 発明の名称 細胞電気穿孔法およびその装置

⑯ 特 願 昭63-284177

⑰ 出 願 昭63(1988)11月10日

⑱ 発 明 者 伊 藤 博 康 静岡県浜松市市野町1126番地の1 浜松ホトニクス株式会
社内

⑲ 出 願 人 浜松ホトニクス株式会 静岡県浜松市市野町1126番地の1
社

⑳ 代 理 人 弁理士 長谷川 芳樹 外3名

明 細 書

1. 発明の名称

細胞電気穿孔法およびその装置

2. 特許請求の範囲

1. 媒液中に含まれた細胞の細胞膜に小孔を形成する細胞電気穿孔法において、

前記媒液に交流電場を印加して前記細胞を前記交流電場の電界方向に配列させる第1のステップと、

前記交流電場の電界方向と交叉する方向に直流パルス電場を印加して前記細胞の細胞膜に小孔を形成する第2のステップと

を備えることを特徴とする細胞電気穿孔法。

2. 前記媒液には前記細胞中に取り込まれる被取込物があらかじめ含まれていることを特徴とする請求項1記載の細胞電気穿孔法。

3. 細胞を含む媒液を入れるための凹部が形成された基体と、

前記凹部に入れられた媒液に電場を印加できるよう前記基体に配設された一対の第1の電極と、この一対の第1の電極による電場の電界方向と交叉する方向で前記媒液に電場を印加できるように前記基体に配設された一対の第2の電極と、

前記第1の電極に交流電圧を供給する交流電源手段と、

前記第1の電極への交流電圧の供給後に前記第2の電極に直流パルス電圧を供給する直流パルス電源手段と

を備えることを特徴とする細胞電気穿孔装置。

4. 前記第2の電極は複数の電極部材により構成され、これら複数の電極部材は前記直流パルス電圧の印加直前まで互いに電気的に分離されていることを特徴とする請求項3記載の細胞電気穿孔装置。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は細胞膜に直流パルス電界によって小孔

を形成する細胞電気穿孔法と、そのために用いられる装置に関するものである。

〔従来の技術〕

バイオテクノロジーの進歩に伴ない、細胞の有する細胞膜に小孔を形成してDNAなどを取り込ませることが重要になっている。

細胞を含む媒液に交流電場を印加すると、細胞が電界方向に一直列に並ぶ現象が知られている（パールチェーン現象）。第4図（a）のように、細胞1を含む媒液2に対して電場を印加するための電極3A、3Bを配設する。そして、電極3A、3Bの間に交流電圧 V_1 を印加すると、細胞1はその電界方向にパールチェーン状に配列する。そこで、スイッチ S_1 をONすることにより電極3A、3B間に直流パルス電圧 V_2 を印加すると、第4図（b）のように細胞1に小孔4が形成されることになる。

ところが、細胞1の細胞膜に形成される小孔4は電界方向に位置しているために、直流パルス電圧 V_2 の印加が解除された後には隣り合う細胞1

が小孔4を介して互いに融合し、巨大細胞になってしまう。このため、個々の細胞1を分離した状態で電気穿孔し、細胞1中にDNAを取り込ませることが難しい。そこで、DNAなどを取り込ませる場合には、第5図のようにして細胞1に小孔を形成することが行なわれている。

第5図（a）に示すように、細胞1を含ませた媒液2に一对の電極3A、3Bを配設しておく。そして、同図（b）のようにスイッチ S_1 をONにして直流パルス電圧 V_2 を印加すると、細胞1の細胞膜が電気穿孔される。このとき、媒液2中にDNAを含ませておけば、電気的に形成された小孔4を介してDNAを細胞1中に取り込ませることができる。そして、スイッチ S_1 をOFFにして直流パルス電圧 V_2 の印加を解除すれば、細胞1に形成された小孔4は修復し、結果としてDNAを取り込んだ細胞1が得られることになる。（発明が解決しようとする課題）

しかしながら、第5図に示す方法では、小孔4の形成される位置が細胞ごとに一定せず、また全

ての細胞について穿孔することも困難である。このため、DNAの取り込み等を全ての細胞について制御性よく行なうことができなかった。

そこで本発明は、媒液中の細胞について、制御性よく小孔を形成することのできる細胞電気穿孔法と、これに用いられる装置を提供することを目的とする。

〔課題を解決するための手段〕

本発明に係る細胞電気穿孔法は、媒液に交流電場を印加して媒液中の細胞を交流電場の電界方向に配列させる第1のステップと、交流電場の電界方向と交叉する方向に直流パルス電場を印加して細胞の細胞膜に小孔を形成する第2のステップとを備えることを特徴とする。ここで、媒液中にはDNAのような物質をあらかじめ含ませておいてもよい。

また、本発明に係る細胞電気穿孔装置は、細胞を含む媒液を入れるための凹部が形成された基体と、凹部に入れられた媒液に電場を印加できるように基体に配設された一对の第1の電極と、この一

対の第1の電極による電場の電界方向と交叉する方向で媒液に電場を印加できるように基体に配設された一对の第2の電極と、第1の電極に細胞を配列させるための交流電圧を供給する交流電源手段と、第1の電極への交流電圧の供給後に第2の電極に細胞膜に小孔を形成するための直流パルス電圧を供給する直流パルス電源手段とを備えることを特徴とする。ここで、第2の電極は複数の電極部材により構成され、これら複数の電極部材は直流パルス電圧の印加直前まで互いに電気的に分離されていることを特徴としてもよい。

〔作用〕

本発明の細胞電気穿孔法によれば、交流電場によって細胞は一定方向に配列され（パールチェーン現象）、この細胞の細胞膜は交流電場と交叉する方向の直流パルス電場により穿孔される。従って、小孔は細胞の同一部位に等しく形成されることになる。このため、媒液中にDNAなどを含ませておけば、同一条件で多数の細胞にDNAなどを取り込ませることができる。

また、本発明の細胞電気穿孔装置によれば、第1の電極によってパルスチェーン現象を生じさせるための交流電場が形成され、第2の電極によって電気穿孔のための直流パルス電場が形成されることになる。ここで、第2の電極を複数の電極部材により形成すれば、第1の電極によるパルスチェーン現象をより直線状にすることが可能になる。

〔実施例〕

以下、添付図面を参照して本発明の一実施例を説明する。

第1図は実施例に係る細胞電気穿孔装置の要部を示している。図示の通り、薄い基板10の中央部には平面形状が略正方形の凹部11が形成され、互いに対向する一対の側壁には第1の電極3A、3Bが配設され、他方の側壁には第2の電極6A、6Bが配設されている。電極3A、3Bにはスイッチ S_1 を介して交流電源からの交流電圧 V_1 が印加されるようになっており、電極6A、6Bにはスイッチ S_2 を介して直流パルス電源からの直

流パルス電圧 V_2 が印加されるようになっている。そして、細胞を含む媒液は凹部11に垂らされる。

基板10は例えば石英ガラスのような透明体で形成され、下方に光源(図示せず)を配設し、上方に顕微鏡を設けることで、細胞の様子を観察できるようになっている。凹部11は一边が1cm程度の大きさであり、その深さは数mm程度とすればよい。また、第1の電極3A、3Bおよび第2の電極6A、6Bは白金(Pt)などで形成される。電極3A、3Bに印加される交流電圧 V_1 は周波数が数MHz程度で、媒体中で10~100V/cm程度の電場を形成する強さになっている。また、電極6A、6Bに印加される直流パルス電圧 V_2 はパルス幅が10~20 μ sec程度で、媒体中で $10^3 \sim 10^4$ V/cm程度の電場を形成する強さになっている。なお、細胞膜が破壊される時に細胞膜にかかる電圧は、細胞の種類によらず一定(1V)であるが、交流電場の周波数および高電圧パルスの波形、長さ、大きさは、パルス時の温度、塩環境、細胞の大きさや種類、媒体の性質な

どにより適宜に変更され、上記の値に限定されないことは当然である。

次に、上記実施例の作用を、第2図を参照して説明する。

まず、スイッチ S_1 、 S_2 をOFFにした状態で凹部11に細胞1を含む媒液2を垂らす。そして、スイッチ S_1 をONにするとパルスチェーン現象により細胞1は一列に配列される。第2図(a)はこの状態を示しており、基板10の下側に光源を設けて上方から顕微鏡で観察すれば、この状態を知ることができる。次に、スイッチ S_2 をONにすることで、直流パルスを交流電場に直交する方向に加えると、第2図(b)のように細胞1に小孔4が形成される。すると、この細胞膜の小孔4を介して媒液2中のDNAが細胞1中に取り込まれる。その直後にスイッチ S_2 をOFFにして直流パルス電場の印加を解除すると、細胞膜の小孔4は徐々に修復し、結果としてDNAが細胞1中に取り込まれることになる。

この場合、細胞1は交流電場によって一定方向

に向きながら一列に配列されており、小孔4を形成するための直流パルス電場は一定方向に加えられている。このため、全ての細胞1については同一部位に略同一の大きさの小孔4を形成できる。また、形成された小孔4の部位は細胞1の配列方向と異なっているため、小孔4の修復過程で細胞1が互いに融合するようなこともない。

第3図は上記実施例を変形した細胞電気穿孔装置の要部を示している。この例では、直流パルス電圧 V_2 を印加するための第2の電極6A、6Bが、それぞれ4個の電極部材6A₁~6A₄、6B₁~6B₄により形成されている。そして、一方の側壁の電極部材6A₁~6A₄はスイッチ S_{21} によって直流パルス電圧 V_2 に接続され、他方の側壁の電極部材6B₁~6B₄はスイッチ S_{22} によって直流パルス電圧 V_2 に接続されているが、スイッチ S_{21} およびスイッチ S_{22} をOFFにした状態(図示の状態)では、各電極部材6A₁~6A₄、6B₁~6B₄は互いに電氣的に分離された状態になっている。

この変形例により電気穿孔を行なう場合には、まず細胞1を含んだ媒液2を基板10の凹部11中に垂らす。そして、スイッチ S_1 をONして電極3A、3Bに交流電圧 V_1 を印加することにより、パールチェーン現象を生じさせて細胞1を配列させる。ここで、細胞1の配列方向は交流電場の電気力線の方向に沿うことになるが、この変形例では第2の電極6A、6Bは4分割され、互いに電気的に分離されているので、第1の電極3A、3B間の交流電圧 V_1 による電気力線が第2の電極6A、6Bに影響されることなく、略直線状に保たれる。このため、スイッチ S_{21} 、 S_{22} をONにした後に細胞1の細胞膜に形成される小孔4の部位を、全ての細胞1についてより一定にすることができる。

なお、第1の電極3A、3Bおよび第2の電極6A、6Bの形状や位置関係には、各種の変形が可能である。例えば電極6Aについては凹部11の底面の基板10に透明電極として設け、電極6Bについては凹部11の蓋体に透明電極として

設けてもよい。

次に、本発明者による具体的な実施例および比較例を説明する。

まず、一辺が1cmで深さが3mmの凹部を中央に形成した石英ガラス板を用意し、この凹部に第1図のような電極を白金(Pt)で形成した。そして、一方の電極対には電圧および周波数が可変の交流電圧源を接続し、他方の電極対には電圧およびパルス幅が可変の直流パルス電源を接続した。更に、石英ガラスからなる基板の下方には白色光源を置き、凹部の上方に光学顕微鏡の対物レンズを対向させた。上記装置を用いて、ウニの卵および人間の赤血球による実験を行なった。

実施例1

海水と略同一濃度のショ糖水溶液を1ml用意し、この中に生きたウニの卵を500個程度入れ試料液とした。次に、この試料液を石英ガラス板の凹部に1~2mmの深さになるまで垂らし、200V/cmの電界強度で2MHzの交流電場を加えた。パールチェーン現象が生じたのを顕微鏡で確認し

た後、400V/cmの電界強度で50 μ secのパルス幅のパルスを1秒間隔で5回だけ印加したところ、ウニの卵に穿孔が見られた。この穿孔は98%以上のウニの卵に対して略同一の部位に略同一の大きさで形成された。また、細胞膜の小孔が修復した後にも、ウニの卵が互いに融合してしまうようなことはなかった。

比較例1

実施例1と同一の試料を用い、交流電場を加えないで直流パルスを印加した。その結果、穿孔が生じたウニの卵は全体の40%程度であった。また、穿孔の部位および大きさも一定していなかった。

実施例2

人間の血液と略同一濃度のショ糖水溶液を1ml用意し、この中に生きた赤血球を1000個程度入れ試料液とした。次に、この試料液を石英ガラス板の凹部に1~2mmの深さになるまで垂らし、300V/cmの電界強度で1MHzの交流電場を加えた。パールチェーン現象が生じたのを顕微鏡

で確認した後、1.0KV/cmの電界強度で5 μ secのパルス幅のパルスを1秒間隔で5回だけ印加したところ、赤血球に穿孔が見られた。この穿孔は98%以上の赤血球に対して略同一の部位に略同一の大きさで形成された。また、細胞膜の小孔が修復した後にも、赤血球が互いに融合してしまうようなことはなかった。

比較例2

実施例1と同一の試料を用い、交流電場を加えないで直流パルスを印加した。その結果、穿孔が生じた赤血球は全体の40%程度であった。また、穿孔の部位および大きさも一定していなかった。

〔発明の効果〕

以上、詳細に説明した通り、本発明では交流電場によって細胞は一定方向に配列され、この細胞は交流電場と交叉する方向の直流パルス電場により穿孔される。従って、小孔は細胞の同一部位に等しく形成されることになる。このため、媒液中にDNAなどを含ませておけば、同一条件で多数の細胞にDNAなどを取り込ませることができる。

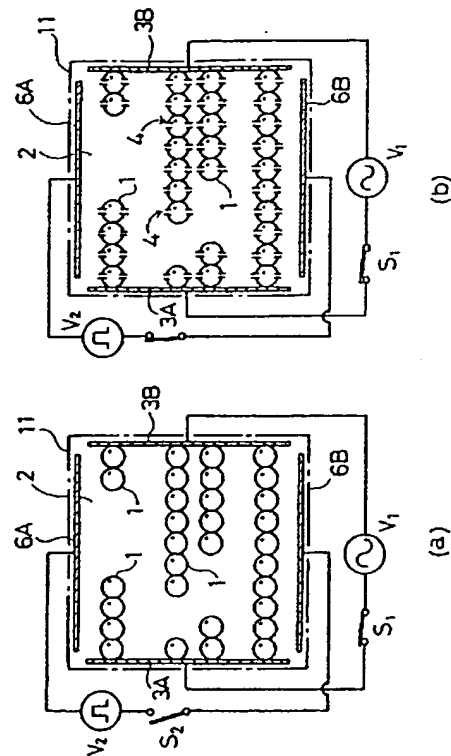
本発明では、媒液中の細胞について制御性よく小孔を形成することのできるの、バイオテクノロジーに関連する工業上の用途に幅広く適用することが可能である。

4. 図面の簡単な説明

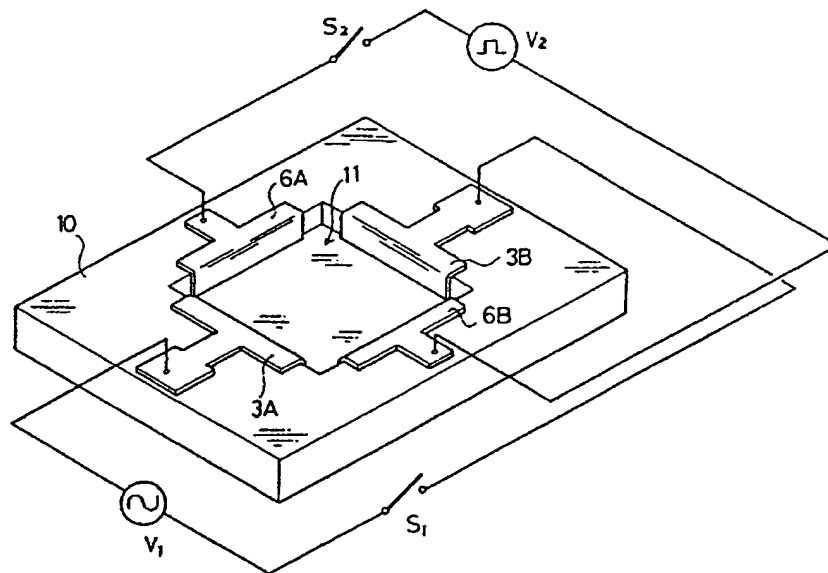
第1図は、本発明の実施例に係る細胞電気穿孔装置の要部の斜視図、第2図は、実施例の作用を説明する図、第3図は、第1図に示す実施例の変形例の要部を示す斜視図、第4図および第5図は、従来技術の説明図である

1…細胞、2…媒液、3A、3B…第1の電極、4…小孔、6A、6B…第2の電極、10…基板、11…凹部、 V_1 …交流電圧、 V_2 …直流パルス電圧。

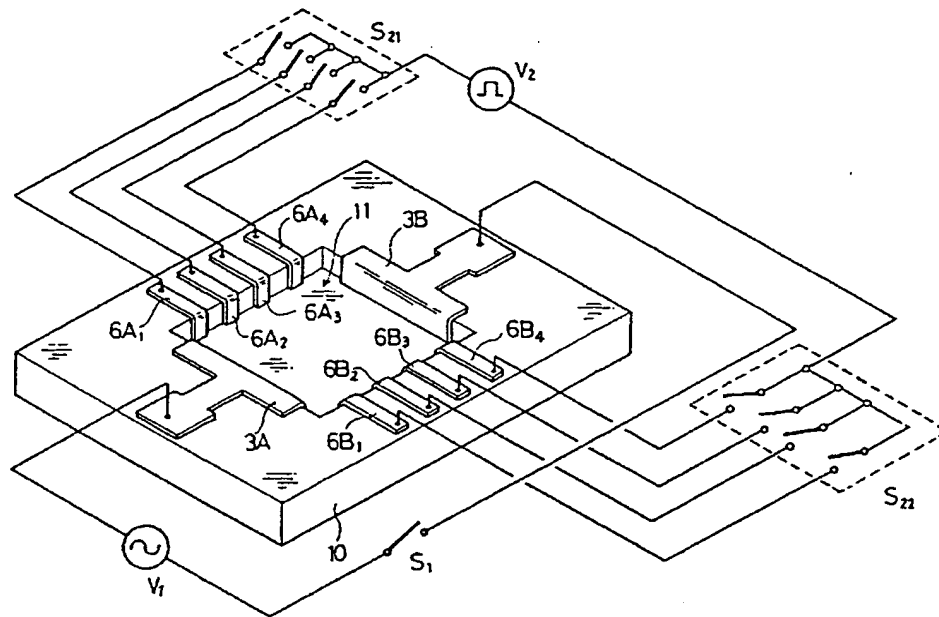
特許出願人 浜松ホトニクス株式会社
代理人弁理士 長谷川 芳 樹



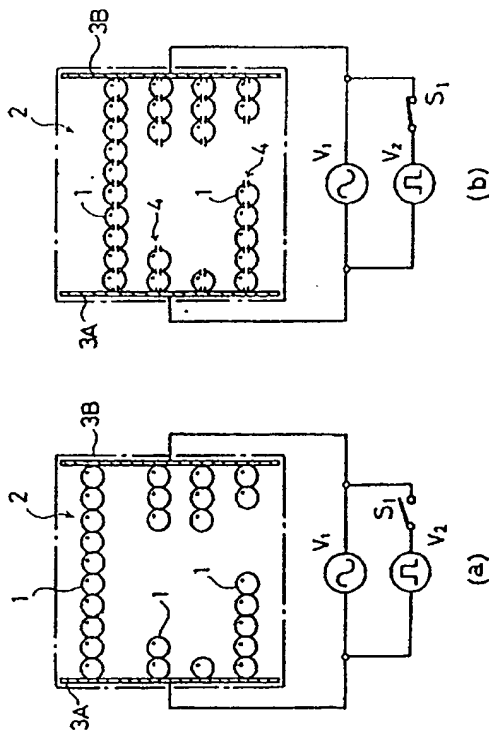
実施例の作用
第2図



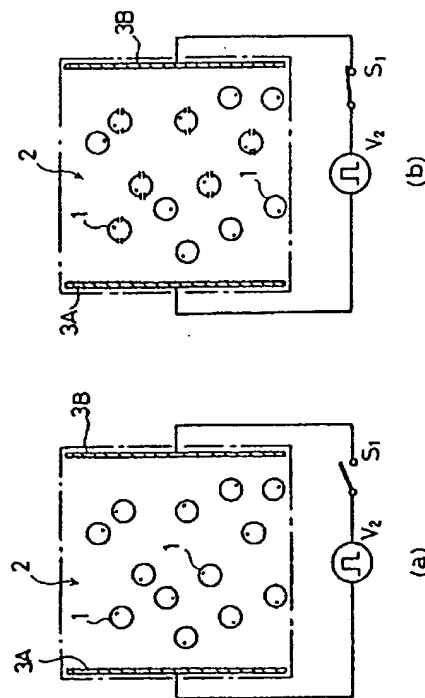
実施例の要部
第1図



変形例の要部
第3図



従来例
第4図



従来例
第5図